

PCT/JP 2004/014903

01.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 18 NOV 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 4 3 6 4 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 4 3 6 4 5]

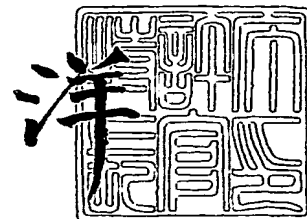
出 願 人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 9 3 1 4

【書類名】 特許願
【整理番号】 H15-1894Q3
【提出日】 平成15年10月 1日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 39/00
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式会社 医
 薬総合研究所内
 【氏名】 上野 裕司
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式会社 医
 薬総合研究所内
 【氏名】 栢下 隆
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式会社 医
 薬総合研究所内
 【氏名】 石原 淳
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醗酵工業株式会社 医
 薬総合研究所内
 【氏名】 中倉 政司
【特許出願人】
 【識別番号】 000001029
 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
 【代表者】 松田 譲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 008187
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

抗体にグリシン及びクエン酸を添加することを特徴とする、溶液中で抗体を安定化する方法。

【請求項 2】

抗体を安定化する方法が、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制および化学的分解物の生成抑制である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

抗体にグリシンを添加することを特徴とする、溶液中で抗体の可溶性会合体の生成を抑制する方法。

【請求項 4】

抗体にクエン酸を添加することを特徴とする、溶液中で抗体の化学的分解物の生成を抑制する方法。

【請求項 5】

抗体濃度が $0.1 \sim 50 \text{ mg/mL}$ である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

グリシンの濃度が $10 \sim 30 \text{ mg/mL}$ である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

クエン酸の濃度が $0.1 \sim 50 \text{ mmol/L}$ である、請求項 1、2 および 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

さらに非イオン性界面活性剤を含有する請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

pH が 4～7 の範囲内である請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

抗体がヒト化抗体またはヒト型キメラ抗体である請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

抗体がガングリオシド GD3 に対する抗体である請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

グリシンと抗体とを含有することを特徴とする、抗体の可溶性会合体の生成が抑制された溶液状抗体製剤。

【請求項 13】

クエン酸と抗体とを含有することを特徴とする、抗体の化学的分解物の生成が抑制された溶液状抗体製剤。

【請求項 14】

グリシン及びクエン酸と抗体とを含有することを特徴とする、抗体の可溶性会合体の生成、化学的分解物の生成および不溶性凝集体の生成が抑制された溶液状抗体製剤。

【請求項 15】

抗体濃度が $0.1 \sim 50 \text{ mg/mL}$ である、請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載の製剤。

【請求項 16】

グリシンの濃度が $10 \sim 30 \text{ mg/mL}$ である、請求項 12、14 および 15 のいずれか 1 項に記載の製剤。

【請求項 17】

クエン酸の濃度が $0.1 \sim 50 \text{ mmol/L}$ である、請求項 13～15 のいずれか 1 項に記載の製剤。

【請求項 18】

さらに非イオン性界面活性剤を含有する請求項 12～17 のいずれか 1 項に記載の製剤。

【請求項 19】

pH が 4～7 の範囲内である請求項 12～18 のいずれか 1 項に記載の製剤。

【請求項 20】

抗体がヒト化抗体またはヒト型キメラ抗体である請求項 12～19 のいずれか 1 項に記載の製剤。

【請求項 21】

抗体がガングリオシド GD3 に対する抗体である請求項 12～20 のいずれか 1 項に記載の製剤。

【請求項 22】

グリシンを有効成分として含有することを特徴とする、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制剤。

【請求項 23】

クエン酸を有効成分として含有することを特徴とする、溶液中での抗体の化学的分解物の生成抑制剤。

【請求項 24】

グリシン及びクエン酸とを有効成分として含有することを特徴とする、抗体安定化剤。

【請求項 25】

抗体の安定化が、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制、化学的分解物の生成抑制および不溶性凝集体の生成抑制である、請求項 24 記載の抗体安定化剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】抗体の安定化方法及び安定化された溶液状抗体製剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、溶液中での抗体の安定化方法および安定化された溶液状抗体製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジーの進歩により、抗体を用いた治療が近年急速に普及している。我が国においても例えばシナジス、レミケード、リツキサン、ハーセプチンなど、種々の抗体製剤が医療現場に提供されている。

抗体を長期間保存する際には、化学的分解物の生成、不溶性凝集体の生成、可溶性会合体の生成などが起こる。そこで、安定でかつ安全な抗体医薬を提供するために、これらの生成物を抑制するための方法が求められている。

【0003】

抗体を溶液状態で長期間保存した場合に、ジスルフィド結合やペプチド結合の開裂などの化学的な分解反応が起こる。その結果、生じる品質の劣化により、活性低下、予期せぬ副作用などが懸念される。

多くのタンパク質において振とうや熱ストレスなどにより、高次構造が崩壊した分子が凝集し、不溶化する。これら不溶性凝集体が静脈内投与された場合、アナフィラキシーショックなどの重篤な副作用が起きやすくなる（特許文献1）。

【0004】

不溶性凝集体の生成を抑制する方法としては、組換えヒトサイトケラチノサイト成長因子（recombinant human keratinocyte growth factor）水溶液の熱ストレスによる不溶性凝集体の生成を抑制する方法として、100 mmol/L以上のクエン酸または0.5%のヘパリンを抗体溶液に添加することが知られている（非特許文献1）。また抗体水溶液の熱ストレスによる不溶性凝集体生成を抑制する方法として、グリシンまたはヒスチジン緩衝液を用いること（特許文献2）、2%以上のポリビニルピロリドンを追加すること（非特許文献2）、リン酸緩衝液および塩化ナトリウムおよびマルトースを追加すること（特許文献3）などが知られている。

【0005】

またタンパク質によっては、不溶化までには至らないが、比較的少数の分子からなる可溶性の会合体を形成することが知られている。例えば抗体の場合は可溶性の2量体ができやすいとされている（非特許文献3）。また抗体の2量体が体内に投与されると、熱、吐き気、低血圧などの副作用が引き起こされる危険性がある（特許文献1）。

可溶性の会合体生成を抑制する方法としては、ニコチン酸誘導体及び親油性側鎖を有する α -アミノ酸などを安定化剤として液体免疫グロブリン製剤に含有させる方法が知られている（特許文献1）。

【0006】

以上のように抗体の安定化は化学的分解物の生成、不溶性凝集体生成、可溶性会合体生成といった複数の不安定化要因を総合的に考慮し、全ての面で安定な抗体製剤を提供することが必要であるが、先行技術にはこのような抗体製剤は知られていない。

【特許文献1】特表平10-502938号

【特許文献2】WO02/13860

【特許文献3】特表平3-504499号

【非特許文献1】Journal of Pharmaceutical Science, vol.83, No.12, 1657-1661 (1994)

【非特許文献2】Pharmaceutical Research, vol.11, NO.5, 624-632, 1994

【非特許文献3】Biochemistry, vol.38, 13960-13967 (1999)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制方法、化学的分解物の生成抑制方法、さらに抗体の安定化方法を提供することを目的とする。また、本発明は、可溶性会合体の生成が抑制された溶液状抗体製剤、化学的分解物の生成が抑制された溶液状抗体製剤、さらに可溶性会合体の生成、化学的分解物の生成および不溶性凝集体の生成が抑制された溶液状抗体製剤ならびに抗体の可溶性会合体の生成抑制剤、抗体の化学的分解物の生成抑制剤および抗体安定化剤の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は以下の(1)～(25)に関する。

(1) 抗体にグリシン及びクエン酸を添加することを特徴とする、溶液中で抗体を安定化する方法。

(2) 抗体を安定化する方法が、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制および化学的分解物の生成抑制である上記(1)記載の方法。

【0009】

(3) 抗体にグリシンを添加することを特徴とする、溶液中で抗体の可溶性会合体の生成を抑制する方法。

(4) 抗体にクエン酸を添加することを特徴とする、溶液中で抗体の化学的分解物の生成を抑制する方法。

(5) 抗体濃度が0.1～50mg/mLである、上記(1)～(4)のいずれか1項に記載の方法。

【0010】

(6) グリシンの濃度が10～30mg/mLである、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の方法。

(7) クエン酸の濃度が0.1～50mmol/Lである、上記(1)、(2)および(4)のいずれか1項に記載の方法。

(8) さらに非イオン性界面活性剤を含有する上記(1)～(7)のいずれか1項に記載の方法。

【0011】

(9) pHが4～7の範囲内である上記(1)～(8)のいずれか1項に記載の方法。

(10) 抗体がヒト化抗体またはヒト型キメラ抗体である上記(1)～(9)のいずれか1項に記載の方法。

(11) 抗体がガングリオシドGD3に対する抗体である上記(1)～(10)のいずれか1項に記載の方法。

【0012】

(12) グリシンと抗体とを含有することを特徴とする、抗体の可溶性会合体の生成が抑制された溶液状抗体製剤。

(13) クエン酸と抗体とを含有することを特徴とする、抗体の化学的分解物の生成が抑制された溶液状抗体製剤。

(14) グリシン及びクエン酸と抗体とを含有することを特徴とする、抗体の可溶性会合体の生成、化学的分解物の生成および不溶性凝集体の生成が抑制された溶液状抗体製剤。

【0013】

(15) 抗体濃度が0.1～50mg/mLである、上記(12)～(14)のいずれか1項に記載の製剤。

(16) グリシンの濃度が10～30mg/mLである、上記(12)、(14)および(15)のいずれか1項に記載の製剤。

(17) クエン酸の濃度が0.1～50mmol/Lである、上記(13)～(15)のいずれか1項に記載の製剤。

【0014】

(18) さらに非イオン性界面活性剤を含有する上記(12)～(17)のいずれか1項に記載の製剤。

(19) pHが4～7の範囲内である上記(12)～(18)のいずれか1項に記載の製剤。

(20) 抗体がヒト化抗体またはヒト型キメラ抗体である上記(12)～(19)のいずれか1項に記載の製剤。

【0015】

(21) 抗体がガングリオシドGD3に対する抗体である上記(12)～(20)のいずれか1項に記載の製剤。

(22) グリシンを有効成分として含有することを特徴とする、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制剤。

(23) クエン酸を有効成分として含有することを特徴とする、溶液中での抗体の化学的分解物の生成抑制剤。

【0016】

(24) グリシン及びクエン酸とを有効成分として含有することを特徴とする、抗体安定化剤。

(25) 抗体の安定化が、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制、化学的分解物の生成抑制および不溶性凝集体の生成抑制である、上記(24)記載の抗体安定化剤。

【発明の効果】

【0017】

本発明の方法、および本発明の安定な溶液状抗体製剤は、抗体の化学的分解の生成、不溶性凝集体の生成及び可溶性会合体の生成を抑制し、溶液中で抗体を安定に保持することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明で使用される抗体には抗体断片も含まれる。これら抗体および抗体断片は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

また、上記の抗体または抗体断片には、ヒト以外の動物の抗体、遺伝子組換え抗体、それらの抗体断片なども含まれる。

【0019】

ここで、遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ヒト抗体などがあげられ、また、ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLとヒト抗体のCHおよびCLとからなる抗体をいう。ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

【0020】

また、ヒト以外の動物とは、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどがあげられる。

ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいう。

本発明のヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRを任意のヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク（以下、FRと表記する）と連結したV領域をコードするcDNAを設計、構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするcDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0021】

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

【0022】

ヒト抗体とは、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を取得し、これを培養して、培養上清中より該抗体を精製することにより得ることができる。ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を生成蓄積させることができる。

【0023】

本発明で使用される抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgG型抗体分子を蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0024】

本発明で使用されるFabは、抗体を蛋白質分解酵素パパイニンで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

F(ab')₂は、IgG型抗体分子を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0025】

本発明で使用されるF(ab')₂は、抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0026】

本発明で使用されるFab'は、F(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0027】

本発明で使用されるscFvは、抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一とすることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。本発明で使用されるdiabodyは、抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAをリンカーのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabodyを製造することができる。

【0028】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法（Protein Engineering, 7, 697-704, 1994）に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明で使用されるdsFvは、抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

【0029】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明で使用されるCDRを含むペプチドは、抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

【0030】

具体的なモノクローナル抗体としては、ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体があげられる。ガングリオシドGD3に対するモノクローナル抗体としては、マウスモノクローナル抗体KM-641（特許3006943号）、ヒト型キメラ抗体KM-871（特開平5-304989）、ヒト型CDR移植抗体KM-8871（W001/23432）などがあげられる。

【0031】

本発明において、化学的分解物とは、抗体のジスルフィド結合またはペプチド結合が開裂したものをいう。具体的には、モノクローナル抗体のH鎖またはL鎖の一部または全てが脱落したものがあげられる。また前述のFab断片、Fab断片のH鎖とL鎖がさらに開裂したものなども包含される。

本発明において、不溶性凝集体とは、高次構造変化などにより分子表面の疎水性が増大し、著しく水溶性が低下した分子が集合し、不溶化したものをいう。したがって、不溶性凝集体が生成されることにより溶液状抗体製剤の濁度が増大する。

【0032】

本発明において、可溶性会合体とは、抗体分子同士が会合しているが、抗体分子の高次構造の変化がないか、または高次構造の変化が比較的軽微であるため、水溶液中で析出し

ない程度に該会合体の水溶性が維持されているものをいう。したがってこれら可溶性会合体の生成により製剤の濁度の増大は生じない。通常会合する抗体の分子数は比較的少なく、通常2~4量体である。

【0033】

本発明の溶液状抗体製剤の製造法は、一般の溶液状製剤の製造で行なわれている方法であれば特に限定されないが、具体的には抗体および添加剤の溶液を予め調製し、それらを混合することにより製造することができる。また抗体または添加剤原料を直接溶媒中に添加し、溶解させることにより製造することもできる。

本発明の溶液中での抗体の安定化方法、溶液中での可溶性会合体の生成抑制方法および溶液中での化学的分解物の生成抑制方法において、抗体濃度としては、好ましくは0.1~50mg/mL、より好ましくは1~20mg/mL、最も好ましくは2~10mg/mLがあげられる。

【0034】

本発明の溶液中での抗体の安定化方法および溶液中での可溶性会合体の生成抑制方法の生成抑制方法において、添加するグリシンの量は、グリシン濃度として好ましくは10~30mg/mL、より好ましくは20~25mg/mL、最も好ましくは22~23mg/mLである。添加するグリシンの形態としては、グリシン、グリシン塩酸塩などの薬学的に許容されるグリシンの塩類などがあげられる。

【0035】

本発明の溶液中での抗体の安定化方法および溶液中での化学的分解物の生成抑制方法において、添加するクエン酸の量は、クエン酸濃度として好ましくは0.1~50mmol/L、より好ましくは0.5~20mmol/L、最も好ましくは1~10mmol/Lがあげられる。添加するクエン酸の形態としては、クエン酸、クエン酸ナトリウムなどの薬学的に許容されるクエン酸の塩類などがあげられる。

【0036】

本発明の抗体溶液中での抗体の安定化方法は、溶液中での抗体の可溶性会合体の生成抑制、化学的分解物の生成抑制および不溶性凝集体の生成抑制に効果を奏する。

本発明の製剤における抗体の濃度としては、好ましくは0.1~50mg/mL、より好ましくは1~20mg/mL、最も好ましくは2~10mg/mLがあげられる。

本発明におけるグリシンの含有量は、グリシン濃度として好ましくは10~30mg/mL、より好ましくは20~25mg/mL、最も好ましくは22~23mg/mLである。添加するグリシンの形態としては、グリシン、グリシン塩酸塩などの薬学的に許容されるグリシンの塩類などがあげられる。

【0037】

本発明におけるクエン酸の含有量は、クエン酸濃度として好ましくは0.1~50mmol/L、より好ましくは0.5~20mmol/L、最も好ましくは1~10mmol/Lがあげられる。添加するクエン酸の形態としては、クエン酸、クエン酸ナトリウムなどの薬学的に許容されるクエン酸の塩類などがあげられる。

本発明の製剤は、上述の抗体、グリシン、クエン酸のほかに、非イオン性界面活性剤を含有させることも可能であり、好適なものとして、ソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油類、ポリエチレングリコール脂肪酸エーテル類、グリセリン脂肪酸エステル類、ショ糖脂肪酸エステル類などがあげられる。特に好ましいものとしてポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（ポリソルベート80）などがあげられる。非イオン性界面活性剤の濃度としては、薬学的に許容される範囲であれば特に制限されないが、好ましくは0.01~10mg/mL、より好ましくは0.05~1mg/mL、最も好ましくは0.1~0.3mg/mLがあげられる。

【0038】

本発明の製剤はpHを適切な値に制御するのが望ましい。適切なpH値としては、好まし

くはpH4～7であり、より好ましくはpH5～6があげられる。pHには、例えば塩酸、硫酸、リン酸、クエン酸、酢酸、乳酸、酒石酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの医薬品として許容される種々のpH調節剤が使用できる。

また本発明の製剤に、以下に例示するような医薬品として許容される添加剤を添加することも可能である。

【0039】

等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなどの無機塩類、グルコース、フルクトース、ラクトース、マルトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、キシリトールなどの糖及び糖アルコール類、グリセリン、デキストラン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ニコチン酸アミドなどがあげられる。

【0040】

無痛化剤としてイノシトール、クロロブタノール、プロピレングリコール、ベンジルアルコール、リドカイン、硫酸マグネシウムなどがあげられる。

保存剤としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチルなどのパラベン類、安息香酸、エタノール、エデト酸四ナトリウム、クエン酸、サリチル酸、ソルビトール、ソルビン酸、グリセリン、クロロブタノール、フェノール、プロピレングリコール、ベンジルアルコールなどがあげられる。

【0041】

粘稠剤としては、アルギン酸ナトリウム、キサンタンガム、グリセリン、ゼラチン、デキストラン、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロースアルキルエーテル類、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールなどがあげられる。

酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、チオグリコール酸ナトリウム、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、塩酸システイン、エデト酸ナトリウムなどがあげられる。

【0042】

本発明の製剤の好ましい投与方法は注射であるが、経皮、経粘膜、経鼻、経肺、経口などの投与経路でも投与することが可能である。特に好ましい投与方法は静脈内または皮下組織内または筋肉内への注射である。また適切な投与装置を用いて、例えば腫瘍、炎症などの病変部位へ直接投与することも可能である。

また本発明の製剤は使用する際に希釈して用いることも可能であり、例えば生理食塩水や糖液などの輸液で希釈し、点滴やシリンジポンプなどにより速度を制御しながら投与することも可能である。

【0043】

本発明の溶液状抗体製剤は、例えば無菌ろ過などの一般的な手法により滅菌した後、無菌的環境下でアンプル、バイアル、シリンジなどの注射剤容器中に封入することにより注射剤として使用することができる。また溶液状抗体組成物を容器中に封入する際に、窒素やアルゴンなどの不活性ガスを用いて容器空間部のガス置換を施すことも可能である。

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明する。しかしながら、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】

【0044】

試料製剤の調製

表1に示す処方1～5の溶液組成物をそれぞれ調製し、無菌ろ過後、ガラス製バイアルに注入し、ゴム栓、アルミキャップで密封し、試料製剤とした。これらの操作は全て無菌的環境下で実施した。抗体は特開平5-304989記載の方法で製造したガングリオシドGD3に対するヒト型キメラ抗体KM-871を用いた。

【0045】

【表1】

| | 抗体濃度 (mg/mL) | 添加物 | pH |
|-----|-----------------|---|----|
| 処方1 | 2 | リン酸: 10 mmol/L | 6 |
| 処方2 | 2 | クエン酸: 10 mmol/L | 6 |
| 処方3 | 2 | クエン酸: 10 mmol/L マンニトール: 50 mg/mL | 6 |
| 処方4 | 2 | クエン酸: 10 mmol/L グリシン: 23 mg/mL | 6 |
| 処方5 | 2 | クエン酸: 10 mmol/L グリシン: 23 mg/mL ポリソルベート80: 0.1 mg/mL | 6 |

【実施例2】

【0046】

安定性試験

実施例1で調製された各試料製剤を40℃、1ヶ月に保存した後、以下の試験項目について安定性試験を実施した。

(1) 内容液の目視観察

各試料製剤の内容液を、白色蛍光灯下、ゆるやかに攪拌しながら目視で観察し、濁りの有無を判定した。

(2) 濁度測定

試料製剤の内容液を石英マイクロセルに採取し、紫外分光光度計（日立U-3300型）で、波長400nmにおける吸光度（O.D. 400）を測定した。

(3) ゲルろ過HPLC

試料製剤の内容液について、以下の条件でHPLCによる分析を行なった。

(HPLC条件)

カラム: TSKgel G3000 SWXL (東ソー)

移動相: 0.3 mol/L 塩化ナトリウムを含む、0.5 mol/L リン酸塩緩衝液

測定波長: 280 nm

流速: 1 mL/min

注入量: 40 μ L

装置: LC-10Aシステム (島津製作所)

HPLCチャート上で、未変化体ピークより高分子量側に溶出された成分のピーク面積の総和を可溶性会合体ピーク面積として、以下の式(1)により可溶性会合体含量を算出した。

【0047】

【数1】

$$\text{可溶性会合体含量 (\%)} = \frac{\text{可溶性会合体ピーク面積}}{\text{総ピーク面積}} \times 100 \quad (1)$$

またHPLCチャート上で、未変化体ピークより低分子量側に溶出された成分のピーク面積の総和を化学的分解物ピーク面積として、以下の式により化学的分解物含量を算出した。

【0048】

【数2】

$$\text{化学的分解物含量 (\%)} = \frac{\text{化学的分解物ピーク面積}}{\text{総ピーク面積}} \times 100 \quad (2)$$

(1) 内容液の目視観察および(2)濁度(O.D. 400)測定の結果を表2に示した。表2において濁度(O.D. 400)の値は測定値から初期値を差し引き、保存期間(40℃、1ヶ月)中の増加量を示している。

【0049】

【表2】

| 40℃、1ヶ月保存 | | |
|-----------|-------------|--------------|
| | 濁りの有無(目視観察) | O.D. 400の増加量 |
| 処方1 | 無 | 0.002 |
| 処方2 | 無 | 0.000 |
| 処方3 | 無 | 0.002 |
| 処方4 | 無 | 0.002 |
| 処方5 | 無 | 0.002 |

全ての処方(処方1～5)において、内容液の目視観察の結果、濁りは観察されなかった。また全ての処方において濁度(O.D. 400)の増大は殆ど認められなかった。

ゲルろ過HPLCの結果を表3に示した。結果は測定値から初期値を差し引き、保存期間(40℃、1ヶ月)中の増加量を示している。

【0050】

【表 3】

| 40℃、1ヶ月保存における増加量 | | |
|------------------|------------|------------|
| | 可溶性会合体 (%) | 化学的分解物 (%) |
| 処方 1 | 0.20 | 1.48 |
| 処方 2 | 0.20 | 0.59 |
| 処方 3 | 0.22 | 0.47 |
| 処方 4 | 0.02 | 0.51 |
| 処方 5 | 0.04 | 0.42 |

処方 1 (リン酸) と処方 2 および 3 (クエン酸) との比較において、化学的分解物の増加量は明らかに処方 2 および 3 の方が少なく、クエン酸の添加により化学的分解物の増加を低減できることが明らかとなった。

また処方 2 および処方 4 との比較において、可溶性会合体の増加量は明らかに処方 4 の方が少なく、グリシンの添加により可溶性会合体の増加を低減できることが明らかとなった。

【0051】

さらに処方 4 にポリソルベート 80 を添加した処方 5 においても、良好な安定性が維持された。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗体医薬を提供するために、優れた安定性を有する抗体製剤が求められている。

【解決手段】 本発明は、化学的分解の生成及び可溶性会合体の生成が抑制された溶液状抗体製剤を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 4 3 6 4 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 6 日

新規登録

東京都千代田区大手町1丁目6番1号
協和醗酵工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.